

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-189029

(43)Date of publication of application : 05.07.2002

(51)Int.Cl.

G01N 33/68
G01N 27/62
G01N 33/483
G01N 33/58
// C12Q 1/37

(21)Application number : 2000-388336

(71)Applicant : SUMITOMO CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 21.12.2000

(72)Inventor : MIKAMI TOSHIYUKI
YANAGI KAZUNORI**(54) DETERMINATION METHOD FOR AMINO ACID SEQUENCE AT N- TERMINAL OF PROTEIN****(57)Abstract:****PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method, in which the amino acid sequence at the N-terminal of a protein is determined efficiently.**SOLUTION:** The determination method for the amino acid sequence at the N-terminal of the protein, whose N-terminal is modified includes a process (1) wherein the protein whose N-terminal is modified is cut by a chemical or biochemical means; a process (2), in which the amino group at the N-terminal of a peptide obtained by the process (1) is labeled with heavy hydrogen; a process (3), wherein regarding the peptide obtained by the process (2), the mass spectrum of fragment ions is acquired; and a peptide which is not labeled with the heavy hydrogen is specified and a process (4), wherein the amino acid sequence of the specified peptide is determined.**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-189029

(P 2 0 0 2 - 1 8 9 0 2 9 A)

(43) 公開日 平成14年7月5日(2002.7.5)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
G01N 33/68	ZNA	G01N 33/68	ZNA 2G045
27/62		27/62	V 4B063
33/483		33/483	E
33/58		33/58	Z
// C12Q 1/37		C12Q 1/37	
審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全8頁)			

(21) 出願番号 特願2000-388336(P 2000-388336)

(22) 出願日 平成12年12月21日(2000.12.21)

(71) 出願人 000002093

住友化学工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72) 発明者 三上 寿幸

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内

(72) 発明者 柳 和則

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内

(74) 代理人 100093285

弁理士 久保山 隆 (外2名)

Fターム(参考) 2G045 AA34 DA36 FB05 FB07
4B063 QA13 QQ20 QR16 QS02

(54) 【発明の名称】 タンパク質のN末端のアミノ酸配列決定方法

(57) 【要約】

【課題】 タンパク質のN末端アミノ酸配列を効率的に決定する方法を提供する。

【解決手段】 (1) N末端が修飾されたタンパク質を化学的または生化学的手段により切断する工程、(2) (1)の工程により得られるペプチドのN末端アミノ基を重水素標識化する工程、(3) (2)の工程により得られるペプチドについて、フラグメントイオンの質量スペクトルを取得し、重水素標識化されていないペプチドを特定する工程、および(4) 該特定されたペプチドのアミノ酸配列を決定する工程を含むことを特徴とするN末端が修飾されたタンパク質のN末端のアミノ酸配列決定方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】(1) N末端が修飾されたタンパク質を化学的または生化学的手段により切断する工程、(2) (1)の工程により得られるペプチドのN末端アミノ基を重水素標識化する工程、(3) (2)の工程により得られるペプチドについて、フラグメントイオンの質量スペクトルを取得し、重水素標識化されていないペプチドを特定する工程、および(4) 該特定されたペプチドのアミノ酸配列を決定する工程を含むことを特徴とするN末端が修飾されたタンパク質のN末端のアミノ酸配列決定方法。

【請求項2】(a) N末端が修飾されていないタンパク質のN末端アミノ基を重水素標識化する工程、(b) (a)の工程により得られるタンパク質を化学的または生化学的手段により切断する工程、(c) (b)の工程により得られるペプチドについて、フラグメントイオンの質量スペクトルを取得し、重水素標識化されたペプチドを特定する工程、および(d) 該特定されたペプチドのアミノ酸配列を決定する工程を含むことを特徴とするN末端が修飾されていないタンパク質のN末端のアミノ酸配列決定方法。

【請求項3】(1) N末端が修飾されたタンパク質を化学的または生化学的手段により切断する工程、(2) (1)の工程により得られるペプチドのN末端アミノ基を重水素標識化する工程及び、(3) (2)の工程により得られるペプチドについて、フラグメントイオンの質量スペクトルを取得し、重水素標識化されていないペプチドを特定する工程を含むことを特徴とするN末端が修飾されたタンパク質のN末端由来のペプチド特定方法。

【請求項4】(a) N末端が修飾されていないタンパク質のN末端アミノ基を重水素標識化する工程、(b) (a)の工程により得られるタンパク質を化学的または生化学的手段により切断する工程、(c) (b)の工程により得られるペプチドについて、フラグメントイオンの質量スペクトルを取得し、重水素標識化されたペプチドを特定する工程を含むことを特徴とするN末端が修飾されていないタンパク質のN末端由来のペプチド特定方法。

【請求項5】タンパク質またはペプチドのN末端アミノ基を重水素標識化する工程が、ペプチドに、pH 5以下で一般式〔1〕



(式中、 R^1 はアルキル基を表わす。但し、 R^1 における水素原子の少なくとも1個は重水素原子で置換されている。)で示される重水素カルボン酸無水物と一般式

〔2〕



(式中、 R^2 はアルキル基を表わす。但し、 R^2 における水素原子は重水素原子で置換されていない。)で示される軽水素カルボン酸無水物との混合物を作用させるか、pH 6以下で一般式〔3〕



(式中、 R^3 は置換されていてもよいアルキル基、置換

されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいナフチル基または置換されていてもよいピリジル基を表わす。但し、 R^3 における水素原子の少なくとも1個は重水素で置換されている。)で示される重水素イソシアネート化合物と一般式〔4〕



(式中、 R^4 は置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいナフチル基または置換されていてもよいピリジル基を表わす。但し、 R^4 における水素原子は重水素原子で置換されていない。)で示される軽水素イソシアネート化合物との混合物を作用させる工程である請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】(1)の工程に先立ちN末端が修飾されたタンパク質に還元Sアルキル化を行う請求項1、3または5に記載の方法。

【請求項7】(a)の工程に先立ちN末端が修飾されていないタンパク質に還元Sアルキル化を行う請求項2、4または5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列の決定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】タンパク質のアミノ酸配列の決定は、タンパク質の構造を確認、同定する手段として重要である。特にタンパク質のアミノ末端部分のアミノ酸配列を決定することは、有用タンパク質をコードする遺伝子の取得などにおいて重要である。天然に存在するタンパク質にはそのアミノ末端(以下、N末端と記す。)が修飾されている場合と修飾されていない2種類のタンパク質が存在する。N末端が修飾されていないタンパク質(以下、N末端未修飾タンパク質と記す。)、即ちN末端アミノ基に置換基を有さないタンパク質のN末端アミノ酸配列決定には、例えば、エドマン分解法が従来から利用されているが、該方法に必要とされる試料量が比較的多いことおよび、該方法に供する試料は精製されたものである必要がある等の欠点がある。また、N末端が修飾されたタンパク質(以下、N末端修飾タンパク質と記す。)、即ち末端アミノ基の水素原子がアセチル基等により置換されたタンパク質のN末端アミノ酸配列決定にはエドマン分解法は利用できない。

【0003】一方、最近では質量分析法を用いるタンパク質のアミノ酸配列の決定の試みも行われてきている。質量分析方法は混合物試料や微量試料にも適用可能であるという特徴を有する。質量分析法を用いたアミノ酸配列決定においては、衝突活性化分解法(以下、CID法と記す)あるいはPost Source Decay(以下、PSD法と記す)による処理により生じるフラグメントイオンの質量スペクトル(以下、フラグメントイオンを取得する方法

10

20

30

40

50

をMS/MS法と、フラグメントイオンの質量スペクトルをMS/MSスペクトルとそれぞれ記す)を取得し、このスペクトルを解析してアミノ酸配列を決定することが行われている。一般にこの方法によってMS/MSスペクトルが得られるのは分子量が約3000程度以下であるため、それを越える高分子量物では通常、化学的または生化学的手段によって切断して分子量3000以下程度以下のペプチドにした後、適用される。例えば、タンパク質を消化酵素等を用いて切断し、得られるペプチドをそれぞれタンデム質量分析することにより各ペプチドのアミノ酸配列は決定できるが、このままではどのペプチドがN末端由来か分らない。

【0004】N末端修飾タンパク質のN末端のアミノ酸配列を決定するためには、タンパク質の切断により生成するペプチドの中から、元のタンパク質のN末端由来のペプチドを特定し、このペプチドのアミノ酸配列を決定する必要がある。N末端修飾タンパク質のN末端由来のペプチドの特定方法としては、タンパク質の切断により生成するペプチド(以下、切断ペプチドと記す。)をBrCN活性化セファロースカラム処理し、吸着されずに溶出されるペプチドを採取する方法(Anal. Biochem., 222, 210-216 (1994))や、切断ペプチドをアセチル化処理し、該アセチル化処理前後の試料の逆相クロマトグラフィーにおける溶出位置を比較することにより元のタンパク質のN末端由来のペプチドを特定する方法(特開平8-27180)等が知られている。

【0005】また、N末端未修飾タンパク質の場合、予めアセチル基等によってN末端を修飾した後に前記した特定方法が適用されている。いずれも煩雑な操作が必要となし、多量の試料が必要となるという点では未だ満足できるものではない。

【0006】さらに、CID法あるいはPSD法による処理によってペプチドは主に主鎖部分で解離が起こり、該ペプチドのN末端を含むフラグメントイオンとC末端を含むフラグメントイオンが生成する(Methods in Enzymology, 193 (1990))。得られるMS/MSスペクトルには、N末端を含むフラグメントイオンのピークとC末端を含むフラグメントイオンのピークが混在しており、解析に多大な労力を要するという問題があった。N末端を含むフラグメントイオンとC末端を含むフラグメントイオンを区別する方法として、例えば、 $H_2^{18}O$ を含む溶液中で酵素により加水分解を行うことによって、断片化された各ペプチドのC末端を ^{18}O で標識し、 ^{18}O 標識されたペプチドと ^{18}O 標識していないペプチドのMS/MSスペクトルを比較する方法が報告されている(RAPID COMMUNICATION IN MASS SPECTROMETRY, Vol. 5, pp312-315 (1991))。しかしながらこの方法では加水分解による断片化を行うことが必須であるため、ペプチド全長の配列を決定するためには煩雑な工程を経ることが必要であった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、タンパク質のN末端部分のアミノ酸配列を効率的に決定する方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】このような状況下、本発明者らはタンパク質のN末端アミノ酸配列の決定方法につき検討した結果、フラグメントイオンの質量スペクトル取得に先立ち、タンパク質またはその切断ペプチドのN末端アミノ基を重水素標識することによりタンパク質のN末端アミノ酸配列を極めて効率的に決定することを見出し、本発明に至った。すなわち本発明は、(1)N末端が修飾されたタンパク質を化学的または生化学的手段により切断する工程、(2)(1)の工程により得られるペプチドのN末端アミノ基を重水素標識化する工程、(3)(2)の工程により得られるペプチドについて、フラグメントイオンの質量スペクトルを取得し、重水素標識化されていないペプチドを特定する工程、および(4)該特定されたペプチドのアミノ酸配列を決定する工程を含むことを特徴とするN末端が修飾されたタンパク質のN末端のアミノ酸配列決定方法および(a)N末端が修飾されていないタンパク質のN末端アミノ基を重水素標識化する工程、(b)(a)の工程により得られるタンパク質を化学的または生化学的手段により切断する工程、(c)(b)の工程により得られるペプチドについて、フラグメントイオンの質量スペクトルを取得し、重水素標識化されたペプチドを特定する工程および(d)該特定されたペプチドのアミノ酸配列を決定する工程を含むことを特徴とするN末端が修飾されていないタンパク質のN末端のアミノ酸配列決定方法に関するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明においてタンパク質とは、 α -アミノ酸がペプチド結合により連結したポリペプチド鎖からなる高分子化合物を言い、通常は分子量4000以上を言う。ペプチドとは、2個以上の α -アミノ酸がペプチド結合により結合したものを言い、通常はアミノ酸数が50以下のものを言う。アミノ末端(N末端と記す場合がある。)が修飾されたとは、タンパク質またはペプチドのアミノ末端のアミノ基の少なくとも1個の水素原子がアシル基等により置換されていることを言う。

【0010】1. N末端が修飾されたタンパク質のN末端のアミノ酸配列決定方法

(1)N末端が修飾されたタンパク質の切断工程

N末端が修飾されたタンパク質の切断方法は特に限定されず、例えば、A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Second Edition, Academic Press, (1993)やMethods in Enzymology, 193, 389-412, (1990)等に記載の化学的切断方法、消化酵素を用いた生化学的切断方法等をあげることができる。具体的には例えば、化学的切断方法としてはBrCN

による切断方法が挙げられ、消化酵素による生化学的切断方法としては、トリプシン、キモトリプシンなどを用いた消化を挙げることができる。N末端修飾タンパク質を切断することにより、該タンパク質が切断された通常は分子量3000以下のペプチドが得られる。

【0011】また、N末端修飾タンパク質がそれを構成するアミノ酸としてシステインを含む場合には、予め例えばヨードアセトアミドや4-ビニルピリジンなどにより還元Sアルキル化処理を行った後、前記タンパク質の切断を行うことが実用上好ましい。この還元Sアルキル化処理自体は公知であり、例えば、A Practical Guideto Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Second Edition, Academic Press, (1993)等に記載の方法に準じて行うことができる。

【0012】(2) (1)の工程により得られるペプチドのN末端アミノ基を重水素標識する工程

(1)の工程で得られるペプチドのN末端アミノ基を重水素標識する方法としては、該ペプチドに重水素含有アシル化剤を作用させてN末端に重水素含有アシル基を導入する方法、ペプチドに重水素含有イソシアネートを作用させてN末端に重水素含有カルバモイル基を導入する方法、ペプチドに重水素含有イソチオシアネートを作用させてN末端に重水素含有チオカルバモイル基を導入する方法等を挙げることができる。ここでペプチドのN末端に導入される重水素含有アシル基、重水素含有カルバモイル基、重水素含有チオカルバモイル基等の重水素標識化のための置換基（以下、重水素置換基と記す。）において、重水素置換基内の重水素原子が溶媒等により容易には水素と置換しないことが好ましく、この点からは重水素原子は重水素置換基の炭素原子に接続していることが好ましい。かかる重水素置換基としては、例えば- COCD_3 基、- COCD_2H 基、- COCDH_2 基、- CONHCD_3 基、- $\text{CON}(\text{CD}_3)_2$ 基、- CONHCD_2H 基、- CONHCD_2 基、 CSNHCD_3 基等を挙げることができる。

【0013】また、該ペプチドのN末端の重水素標識化は全てのペプチドで行うのではなく、その一部で行うことが好ましく、この部分重水素標識化における重水素標識化されていないN末端は重水素置換基に対応した重水素を含有していない置換基（以下、軽水素置換基と記す。例えば、- COCD_3 基、- COCD_2H 基及び- COCDH_2 基に対応する- COCH_3 基がこれに当る。）で同様に置換されている。従ってペプチドのN末端の重水素標識化は通常、重水素置換基導入剤と軽水素置換基導入剤との混合物をペプチドに作用させることにより行われる。

【0014】ペプチドに、重水素置換基導入剤と軽水素置換基導入剤の混合物を作用させて、N末端アミノ基を重水素標識化すると、軽水素置換基が導入されたペプチドと、重水素置換基が導入されたペプチドの2種類の分

子種が得られる。これらは、N末端の重水素の数だけ質量に違いが生じる。

【0015】重水素置換基中の重水素の数は1個以上あれば良いが、解析上2個～5個程度が望ましい。重水素置換基導入剤と軽水素置換基導入剤のモル比は解析を行う上では、1/1程度が望ましい。

【0016】(1)の工程により得られるペプチドのN末端アミノ基を重水素標識する工程において、ペプチドに、pH5以下で一般式〔1〕



（式中、 R^1 はアルキル基を表わす。但し、 R^1 における水素原子の少なくとも1個は重水素原子で置換されている。）で示される重水素カルボン酸無水物と一般式

〔2〕



（式中、 R^2 はアルキル基を表わす。但し、 R^2 における水素原子は重水素原子で置換されていない。）で示される軽水素カルボン酸無水物との混合物を作用させるか、pH6以下で一般式〔3〕



（式中、 R^3 は置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいナフチル基または置換されていてもよいピリジル基を表わす。但し、 R^3 における水素原子の少なくとも1個は重水素で置換されている。）で示される重水素イソシアネート化合物と一般式〔4〕



（式中、 R^4 は置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいナフチル基または置換されていてもよいピリジル基を表わす。但し、 R^4 における水素原子は重水素原子で置換されていない。）で示される軽水素イソシアネート化合物との混合物を作用させることにより、ペプチドに対する重水素カルボン酸無水物〔1〕と軽水素カルボン酸無水物〔2〕との混合物あるいは重水素イソシアネート化合物〔3〕と軽水素イソシアネート〔4〕との混合物の使用量を厳密に制御しなくとも、比較的広い範囲でε-アミノ共存下においてもN末端に極めて選択性よく目的とする置換基を導入することができる。

【0017】(2)-2 ペプチドへのカルボン酸無水物またはイソシアネート化合物処理工程

i) 重水素カルボン酸無水物〔1〕と軽水素カルボン酸無水物〔2〕との混合物処理

ペプチドにpH5以下で重水素カルボン酸無水物〔1〕と軽水素カルボン酸無水物〔2〕との混合物（以下、単にカルボン酸無水物混合物〔1〕〔2〕と記す場合がある。）を作用させることにより、N末端が選択的に使用するカルボン酸無水物混合物に対応したアシル基で置換されたペプチドが得られる。使用するカルボン酸無水物混合物〔1〕〔2〕中の重水素カルボン酸無水物〔1〕

7
の割合により、該アシル基中の重水素含有アシル基の割合が決まることとなる。重水素カルボン酸無水物〔1〕におけるR¹は直鎖または分岐アルキル基であり、好ましくはメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等のC1～6の直鎖または分岐アルキル基を挙げることができ、具体的には、無水酢酸、プロピオン酸無水物、酪酸無水物、吉草酸無水物等を挙げることができる。但し、該直鎖または分岐アルキル基において水素原子のうち少なくとも1個は重水素で置換されている。また、軽水素カルボン酸無水物〔2〕にお

けるR²は水素原子が重水素で置換されていない以外はR¹と同じである。
【0018】本処理はpH5以下、好ましくはpH2～5の範囲、さらに好ましくはpH3～5の範囲で行われる。本処理において、通常は前記pHを保持するための緩衝液を溶媒として使用する。該溶媒としては、酢酸水溶液、ギ酸水溶液、ピリジン-酢酸緩衝液、トリフルオロ酢酸水溶液等の揮発性溶媒が、後処理の簡便さの点で好ましい。通常は、本処理は、ペプチドおよび該溶媒からなる溶解または懸濁液に、カルボン酸無水物混合物

〔1〕〔2〕またはそのテトラヒドロフラン等の溶液を添加することにより行われる。本処理は、選択性の点から約10℃以下で、使用する溶媒が凍らない範囲の温度で行うことが好ましい。処理時間は通常、1～60分程度である。
【0019】カルボン酸無水物混合物〔1〕〔2〕の処理系内の濃度は系内の初期濃度として通常、pH5で処理を行う場合には、約10～30mM、pH3.3で処理を行う場合には、約60～300mM程度である。本処理において処理後、処理液からN-アシル化されたペプチドを回収する。例えば、溶媒として揮発性の溶媒を用いた場合は、処理液を減圧下に留去すればよい。不揮発性の塩を含む溶媒を用いた場合には、脱塩処理を行った後溶媒を減圧留去すればよい。本処理を行うことにより、N末端のみが選択的に使用するカルボン酸無水物混合物〔1〕

〔2〕に対応してアシル化されたペプチドが得られる。

【0020】ii) 重水素イソシアネート化合物〔3〕と軽水素イソシアネート化合物〔4〕との混合物処理

(i)の工程により得られるペプチドに、pH6以下で重水素イソシアネート化合物〔3〕と軽水素イソシアネート化合物との混合物（以下、単にイソシアネート化合物混合物〔3〕〔4〕と記す場合がある。）を作用させることにより、N末端アミノ基が選択的にカルバモイル化されたペプチドが得られる。使用するイソシアネート化合物混合物〔3〕〔4〕の割合により、該カルバモイル基中の重水素含有カルバモイル基の割合が決まることとなる。重水素イソシアネート化合物〔3〕におけるR¹は、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいナフチル基または置換されていてもよいピリジル基である。置換され

ていてもよいアルキル基としては、例えばフッ素原子、塩素原子、臭素原子、よう素原子等のハロゲン原子で置換されていてもよいアルキル基を挙げることができ、具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等のC1～6アルキル基、クロロメチル基、ヨードメチル基、ジプロモメチル基、トリフルオロメチル基、ヨードエチル基等のC1～6ハロアルキル基を挙げることができる。置換されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいナフチル基としては、例えばフェニル基、p-クロロフェニル基、o-プロモフェニル基、2,4-ジクロロフェニル基等のハロゲン置換フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基等のナフチル基、1-ヨードナフチル基、2-クロロナフチル基等のハロゲン置換ナフチル基等を挙げることができる。置換されていてもよいピリジル基としては、例えば2-ピリジル基、3-ピリジル基、4-ピリジル基等のピリジル基や、2-クロロ-4-ピリジル基、3,5-ジフルオロ-2-ピリジル基等のハロゲン置換ピリジル基を挙げることができる。但し、前記した置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいナフチル基または置換されていてもよいピリジル基において水素原子のうち少なくとも1個は重水素で置換されている。

【0021】重水素イソシアネート化合物〔3〕としては具体的には、フェニルイソシアネート、p-クロロフェニルイソシアネート、1-ナフチルイソシアネート、2-ナフチルイソシアネート、ブチルイソシアネート、エチルイソシアネート、4-ピリジルイソシアネート、3-ピリジルイソシアネート等を挙げることができる。また、軽水素イソシアネート化合物〔4〕におけるR¹は水素原子が重水素で置換されていない以外はR¹と同じである。本処理はpH6以下で行われ、好ましくはpH約3～6の範囲、さらに好ましくはpH約5～6で行われる。

【0022】本処理において、通常は前記pHを保持するための緩衝液を溶媒として使用する。該溶媒としては、酢酸水溶液、ギ酸水溶液、ピリジン-酢酸緩衝液、トリフルオロ酢酸水溶液等の揮発性溶媒が、後処理の簡便さの点で好ましい。通常は、本処理は、ペプチドおよび該溶媒からなる溶解または懸濁液に、イソシアネート化合物混合物〔3〕〔4〕またはそのテトラヒドロフラン等の溶液を添加することにより行われる。処理温度としては、例えば使用する溶媒が凍らない程度の低温から50℃程度の範囲を挙げることができる。処理時間は通常、1～60分程度である。イソシアネート化合物混合物〔3〕〔4〕の処理系内の濃度は系内の初期濃度として通常、pH6で処理を行う場合には、約2～300mM程度である。

【0023】本処理後、処理液からN-カルバモイル化されたペプチドを回収する。例えば、溶媒として揮発性

の溶媒を用いた場合は、処理液を減圧下に留去すればよい。不揮発性の塩を含む溶媒を用いた場合には、脱塩処理を行った後、溶媒を減圧留去すればよい。本処理を行うことにより、N末端のみが選択的に使用するイソシアネート化合物混合物〔3〕〔4〕に対応してカルバモイル化されたペプチドが得られる。

【0024】(3) (2)の工程により得られるペプチドについてフラグメントイオンの質量スペクトルを取得し、N末端に由来するペプチドを特定する工程

(2)の工程により得られるペプチドのうち、N末端以外のペプチドは、水素(H;質量数1)から成る試薬でN末端が修飾された分子種と、重水素(D;質量数2)を含む標識試薬でN末端が修飾された分子種の質量数の違う2種類の分子種となる。すなわち、反応生成物の質量スペクトルを測定すると、N末端以外のペプチド断片はN末端の重水素の数だけ質量差に違いが生じた2本のピークとなる。一方、N末端由来のペプチドはN末端が元々置換されているので、(2)の工程における重水素標識化の影響を受けず、前記した2本のピークを生じない。(2)の工程により得られるペプチドの質量分析を行い、重水素の数の質量差が生じた2本のピークとなっていないペプチドを特定することにより、これをN末端修飾タンパク質のN末端に由来するペプチドであるとして行うことができる。

【0025】MS/MSスペクトルの取得の方法としては、ペプチドを主鎖部分で開裂させた質量スペクトルを分析できる方法であればよく、質量分析装置の種類、イオン化法、ペプチドのフラグメント化方法は特に限定されない。例えば、最新のマスマススペクトロメトリー(化学同人)、Methods in Enzymology, 270, 453-586 (1996)等に記載の質量分析装置、イオン化法、ペプチドのフラグメント化方法を使用することができる。例えば、質量分析装置としてはイオントラップ質量分析計、四重極型質量分析計、磁場型質量分析計、飛行時間型質量分析計、フーリエ変換型質量分析計などを挙げることができ、イオン化法としてはエレクトロスプレーイオン化法(ESI法)、MALDI法、FAB法などが挙げられる。ペプチドのフラグメント化方法としてはCID法、PSD法などによる処理が挙げられる。

【0026】(4)該特定されたペプチドのアミノ酸配列を決定する工程

かくして特定されたタンパク質のN末端由来のペプチドのフラグメントイオンを、例えば、タンデム質量分析に供し、MS/MSスペクトルを取得し、該スペクトルデータを解析することにより、そのアミノ酸配列を決めることができる。タンデム質量分析の方法としては、(3)の工程で適用可能な方法を同様に用いることができる。

【0027】2. N末端未修飾タンパク質のN末端のアミノ酸配列決定方法

(a) N末端未修飾タンパク質のN末端 α -アミノ基の

重水素標識する工程

N末端未修飾タンパク質のN末端を重水素標識する方法としては、該ペプチドに重水素含有アシル化剤を作用させてN末端に重水素含有アシル基を導入する方法、ペプチドに重水素含有イソシアネートを作用させてN末端に重水素含有カルバモイル基を導入する方法、ペプチドに重水素含有イソチオシアネートを作用させてN末端に重水素含有チオカルバモイル基を導入する方法等を挙げることができる。本工程の処理においては、前記1.(2)における(1)の工程後に得られるペプチドに代えてN末端未修飾タンパク質を用いる以外は1.(2)の工程の方法を同様に適用することができる。

【0028】(b) (a)の工程で得られるタンパク質の切断工程

(a)の工程により得られたタンパク質を化学的または生化学的手段により切断することにより、それぞれのタンパク質が切断された通常は分子量3000以下のペプチドが得られる。該タンパク質の切断方法については、1.(1)の工程において用いたN末端修飾タンパク質に代えて、(a)の工程により得られたタンパク質を用いる以外は1.(1)の工程の方法を同様に適用することができる。

【0029】(c) (b)の工程により得られるペプチドについて、フラグメントイオンの質量スペクトルを取得し、重水素標識化されたペプチドを特定する工程

(b)の工程により得られるペプチドについて、フラグメントイオンの質量スペクトルを取得し、得られるデータから重水素標識化による含有重水素の数の質量差が生じた2本のピークとなっているペプチドを特定することにより、これをタンパク質のN末端に由来するペプチドであると特定することができる。MS/MSスペクトルの取得の方法は前記1.(3)の工程に記載の方法と同様の方法を適用できる。

【0030】(d)該特定されたペプチドのアミノ酸配列を決定する工程

かくして特定されたタンパク質のN末端由来のペプチドのフラグメントイオンを、例えば、タンデム質量分析に供することにより、そのアミノ酸配列を決めることができる。タンデム質量分析の方法としては、(c)の工程で適用可能な方法を同様に用いることができる。

【0031】本工程のタンパク質のN末端に由来するペプチドのアミノ酸配列決定において、該ペプチドのN末端は重水素標識化されているので、このペプチドの質量分析を行った場合には、N末端を含むフラグメントイオンのみが、ペプチドに含まれる重水素置換基における重水素の数だけ質量差を生じることになるので、該スペクトルデータ上で重水素の数だけ質量変化がある二重になったフラグメントイオンのピークを特定することにより、これをN末端アミノ基由来のフラグメントイオンと判定でき、該質量変化のないフラグメントイオンのピー

クを特定することにより、これをC末端カルボキシル基由来のフラグメントイオンと判定できる。そして、このようにして特定されたペプチドのC末端カルボキシル基由来のフラグメントイオンデータとN末端アミノ基由来のフラグメントイオンデータをそれぞれ、例えばMethods in Enzymology, 193 (1990)に記載の方法によりMS/MSスペクトルデータ上で質量の順にたどり、その質量差からアミノ酸の特定及びその配列順序を解析することができ、これらの結果から、ペプチドのアミノ酸配列を決定することができる。もちろんいずれか一方のみを解析することによってもペプチドのアミノ酸配列を決定することは多くの場合可能であるが、N末端アミノ基由来のフラグメントイオンデータより求められるアミノ酸配列とC末端カルボキシル基由来のフラグメントイオンデータより求められるアミノ酸配列の両者を解析することにより、より正確にペプチドのアミノ酸配列を決定することができ、特に、ある特定部分のフラグメントイオンが検出されない等により、N末端アミノ基由来、C末端カルボキシル基由来のいずれか一方の解析ではアミノ酸配列の決定が困難となり得る場合により効果的に目的が達せられるので、ペプチドの確実なアミノ酸配列決定が図れることとなる。

【0032】尚、本発明のN末端修飾タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列決定方法および、N末端未修飾タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列決定方法については、電気泳動によって分離されたタンパク質をゲルに保持させた状態で適用することも可能である。

【0033】本発明のN末端修飾タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列決定方法および、N末端未修飾タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列決定方法は、多検体の並列処理が可能であり、並列処理した多検体試料については質量分析法にて迅速に測定することができる。さらに、これらの工程は自動化が可能であるため、多検体を迅速に処理することができる。

【0034】上記に示した方法により、多くのタンパク質のN末端配列を迅速に決定することが可能となり、例えばゲノム配列と対比することにより、開始コドンの確定や翻訳開始シグナルの同定が迅速にできる。

【0035】

【実施例】以下、本発明を参考例および実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

(1) N末端が修飾されたタンパク質であるウマチトクロムc (シグマ社製) 200 μ gを1%炭酸水素アンモニウム溶液200 μ Lに溶解し、1mg/mLキモトリプシン4 μ Lを添加し、37℃で18時間インキュベートする。

【0036】(2) 前記キモトリプシン消化物の反応液5 μ Lを減圧濃縮し、残渣に0.1Mピリジン-酢酸 (pH 5.0) を12 μ L添加する。試料を氷上で1分間インキュベート

した後、0.1M無水酢酸/無水テトラヒドロフランと無水酢酸の重水素置換体を用いた0.1M無水酢酸d-6/無水テトラヒドロフランを1:1で混合した試薬を5 μ L添加し、氷上で5分間インキュベートする。反応後、溶媒を減圧下に留去し、残渣を質量分析用反応試料とする。質量分析は二重収束型質量分析計 (日本電子、型式JMS-HX/HX110A) を使い、FABイオン化法を使用する。各試料を水・メタノール・酢酸 (50:50:1) 2 μ Lに溶解し、試料溶液1 μ Lをグリセロール・チオグリセロール (1:1) 1 μ Lと混合して質量分析計に供し、FAB-MS測定を行う。反応試料のFABマスペクトルにおいて検出されたマトリックス以外のピークのうち、m/z1162.5以外のピークは3amuの差がある2本のピークとして検出され、m/z1162.5のピークは通常の同位体分布を示す。従って、m/z1162.5のピークがウマチトクロムcのN末端由来のペプチドと特定できる。このm/z1162.5ピークのFAB-MS/MSスペクトルを取得し、N末端構造をAc-GDVEKGKKIFと決定でき、このN末端構造は既に知られているチトクロムcのN末端構造であることがわかる。

【0037】実施例2

実施例1の(1)で得られるキモトリプシン消化物の反応液5 μ Lを減圧濃縮し、残渣に0.1Mピリジン-酢酸 (pH 6.0) を12 μ L添加する。前記検体を氷上で1分間インキュベートした後、0.1Mイソシアン酸フェニル/無水テトラヒドロフランとイソシアン酸のフェニル基の重水素置換体を用いた0.1Mイソシアン酸フェニル-d/無水テトラヒドロフランを1:1で混合した試薬を5 μ L添加し、氷上で5分間インキュベートする。反応後、溶媒を減圧下に留去し、残渣を質量分析用反応試料とする。質量分析は実施例1と同じ装置を使用し、試料を水・メタノール・酢酸 (50:50:1) 2 μ Lに溶解し、試料溶液1 μ Lをグリセロール・チオグリセロール (1:1) 1 μ Lと混合して質量分析計に供し、FAB-MS測定する。反応処理後の試料のFAB-MSスペクトルにおいて検出されたマトリックス以外のピークのうち、m/z1162.5以外のピークは5amuの差がある2本のピークとして検出され、m/z1162.5のピークは通常の同位体分布を示す。従って、m/z1162.5のピークがウマチトクロムcのN末端由来のペプチドと同定できる。

【0038】実施例3

(1) N末端が修飾されていないタンパク質である組換えヒト成長ホルモン (以下、hGHと記す。) 200pmolを0.1Mピリジン-酢酸 (pH 5.0) 12 μ Lに溶解し、氷上で1分間インキュベートした後、0.1M無水酢酸/無水テトラヒドロフランと無水酢酸の重水素置換体を用いた0.1M無水酢酸d-6/無水テトラヒドロフランを1:1で混合した試薬を5 μ L添加し、氷上で5分間インキュベートする。反応後、溶媒を減圧下に留去する。

【0039】(2) (1)で得られる反応処理したhGH200pmolを100mM炭酸水素アンモニウム溶液50 μ Lに溶解し、0.

10

20

30

40

50

1mg/mLトリブシン5 μ Lを添加し、37℃で18時間インキュベートする。前記トリブシン消化物の反応液を減圧濃縮し、反応試料とする。

【0040】(3) 質量分析は二重収束型質量分析計

(日本電子、型式JMS-HX/HX110A)を用い、FABイオン化法を使用する。反応試料を水・メタノール・酢酸(50・50・1)4 μ Lに溶解し、試料溶液1 μ Lをグリセロール・チオグリセロール(1・1)1 μ Lと混合して質量分析計に供し、FAB-MS測定する。反応試料のFABマスペクトルにおいて検出されたピークのうち、 m/z 972.4のピークだけが重水素置換体を含んだダブルピークとなつて検出される。従つて、 m/z 972.4のピークがhGHのN末端由来のペプチドと特定できる。この m/z 972.4ピークはhGHのN末端構造FPTIPLSRがアセチル化されたものと一致する。

【0041】実施例4

(1) N末端が修飾されていないタンパク質である組換えヒト成長ホルモン(以下、hGHと記す。)を試料として使用して電気泳動ゲル上のタンパク質のN末端の解析を行う。電気泳動はMultiphorIIシステム(ファルマシア)、SDS-PAGE用ゲルExcelGel SDS gradient 8-18(ファルマシア)を用い、hGH試料0.5 μ gを泳動する。泳動後のゲルはクーマシーブリリアントブルー(以下、CBBと記す。)を水/メタノール/酢酸(40・60・1)で0.1%濃度に調製した溶液で10分間浸して染色し、水/メタノール/酢酸(40・60・1)中で1時間浸して脱色を行う。CBB染色操作後、hGHに相当するバンドを切り出す。

【0042】(2) システインの還元アルキル化処理を以下のように行う。ゲルを1.5mLのチューブに入れ、50 μ Lの0.1M炭酸水素アンモニウム溶液と50 μ Lのアセトニトリルを添加して30分浸透する。この操作を3回繰り返した後、10mMジチオスレイトール/0.1M炭酸水素アンモニウム溶液を添加して1時間56℃で保温する。溶液を廃棄した後、55mMヨードアセトアミド/0.1M炭酸水素アンモニウムを添加して室温で45分反応させる。溶液を廃棄した後、50 μ Lの0.1M炭酸水素アンモニウム溶液と50

μ Lのアセトニトリルを添加して30分浸透する操作を3回繰り返し、ゲルに含まれている溶媒を減圧下で留去する。

【0043】(3) 前項により得られる還元アルキル化処理したゲルを準備し、イソシアン酸フェニルで処理する。還元アルキル化処理したゲルに12 μ Lの0.1Mピリジン-酢酸(pH6.0)と0.1Mイソシアン酸フェニル/無水テトラヒドロフランとイソシアン酸のフェニル基の重水素置換体を用いた0.1Mイソシアン酸フェニル-d/無水テトラヒドロフランを1:1で混合した試薬を5 μ L添加し、氷中で10分反応させた後、減圧下で溶媒を留去することでフェニルイソシアネート処理する。

【0044】(4) (3)で得られるイソシアン酸フェニル処理したゲルに0.1mg/mLのトリブシンを5 μ Lと15 μ Lの0.1M炭酸水素アンモニウムを添加して、37℃で18時間反応させることによってタンパク質を切断する。切断後、ゲルに水/アセトニトリル/酢酸(50・50・5)を50 μ L添加して40分間浸透させ、上清を集める操作を2回繰り返して、切断ペプチドを抽出し、溶媒を減圧下に留去した後、残渣を質量分析に供す。質量分析は二重収束型質量分析計(日本電子、型式JMS-HX/HX110A)を用い、FABイオン化法を使用する。グリセロール・チオグリセロール(1・1)を水・メタノール・酢酸(50・50・1)で20%に希釈したマトリックスを使用する。試料を水・メタノール・酢酸(50・50・1)1 μ Lに溶解し、試料溶液1 μ Lをマトリックス1 μ Lと混合して質量分析計に供し、FAB-MS測定する。反応試料のFABマスペクトルにおいて検出されたピークのうち、 m/z 1049.4のピークだけが重水素置換体を含んだダブルピークとなつて検出される。従つて、 m/z 1049.4のピークがhGHのN末端由来のペプチドと特定できる。この m/z 1049.4ピークはhGHのN末端構造FPTIPLSRがカルバモイル化されたものと一致する。

【0045】

【発明の効果】本発明によれば、タンパク質のN末端アミノ酸配列を効率的に決定する方法を提供できる。